

# (19)대한민국특허청(KR) (12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>  
C12N 15/63

(45) 공고일자 2004년05월17일  
(11) 등록번호 10-0431724  
(24) 등록일자 2004년05월04일

(21) 출원번호 10-2001-0030975  
(22) 출원일자 2001년06월02일

(65) 공개번호 10-2002-0092089  
(43) 공개일자 2002년12월11일

(73) 특허권자 한국생명공학연구원  
대전 유성구 어은동 52번지

(72) 발명자 이지원  
대전광역시유성구전민동464-1엑스포아파트206동901호

김성우  
서울특별시용산구신창동77-36

(74) 대리인 이원희

심사관 : 이충호

(54) 인간 웨리틴 유전자의 발현벡터, 이를 포함하는 대장균 형질전환체 및 상기 형질전환체를 이용한 인간 웨리틴 단백질의 제조방법

요약

본 발명은 인간 웨리틴(ferritin) 유전자의 발현벡터, 이를 포함하는 대장균 형질전환체 및 상기 형질전환체를 이용한 웨리틴 단백질의 제조방법에 관한 것으로써, 본 발명에 따르면 재조합 인간 웨리틴을 대량으로 생산할 수 있으며, pH 시프트(shift) 공정만으로도 활성형의 재조합 인간 웨리틴을 고농도 및 고효율로 분리할 수 있다.

대표도

도 5

백인어

웨리틴(ferritin) 단백질, pH 시프트(shift) 공정

명세서

도면의 간단한 설명

도 1 은 본 발명의 발현벡터 pT7-FerL의 제조과정을 나타낸 개략도이고,  
도 2 는 대장균에서 재조합 인간 웨리틴(ferritin) 경쇄(Light Chain; 이하 "L-사슬"이라고 한다)을 발현시킨 후 총세포 파쇄액(whole cell lysates), 세포파쇄-원심분리 후 균체 침전물(cell pellet) 및 배양상등액(supernatant)의 환원성 SDS-PAGE 분석 결과를 보여주는 전기영동 사진이고,  
레인 M : 사이즈 마커

레인 1 : 총 세포 파쇄액, 레인 2 : 배양 상등액

레인 3 : 균체 침전물, 레인 4 : 표준형 인간 페리틴(L-사슬)

도 3 은 대장균에서 불용성 응집체의 형태로 발현된 재조합 L-사슬 인간 페리틴의 환원성 및 비환원성 SDS-PAGE 분석 결과를 보여주는 전기영동 사진이고,

레인 M : 사이즈 마커, 레인 1 : 환원성 응집체

레인 2 : 비환원성 응집체, 레인 3 : 표준형 인간 페리틴(L-사슬)

R : 환원성, NR : 비환원성

도 4 는 대장균에서 불용성 응집체의 형태로 발현된 재조합 L-사슬 인간 페리틴을 분리하여 pH 시프트(shift) 방법으로 간단히 용해시킨 후 수행한 전기영동 사진이고,

레인 M : 사이즈 마커,

레인 1 : pH 시프트 공정 전에 분리된 불용성 응집체,

레인 2 : pH 시프트 공정 후의 배양 상등액,

레인 3 : pH 시프트 공정 후의 단백질 침전물

도 5 는 pH 시프트 방법으로 용해된 본 발명의 재조합 L-사슬 인간 페리틴 단백질의 철분결합 활성을 보여주는 전기영동 사진이다.

레인 1 : BSA(bovine serum albumin) (20 $\mu$ g),

레인 2 : 재조합 L-사슬 인간 페리틴 (20 $\mu$ g),

레인 3 : 표준형 인간 페리틴 (20 $\mu$ g)

## 발명의 상세한 설명

### 발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 인간 페리틴(ferritin) 유전자의 발현벡터, 이를 포함하는 대장균 형질전환체 및 상기 형질전환체를 이용한 페리틴 단백질의 제조방법에 관한 것이다.

사람 또는 동물장기에서 어떻게 얻어진 여러 중요한 단백질을 유전자 재조합 방법으로 미생물에서 생산하려면 목적 단백질의 유전자를 발현벡터에 클로닝하여 재조합 발현벡터를 얻고 이를 적당한 숙주세포에 형질전환시켜야 한다. 여러 미생물 중에서 대장균은 다른 생물체에 비하여 그 유전자와 대사체계에 대한 정보가 가장 알려져 있어 유전자 재조합 기술에 의하여 유용한 외래 단백질을 생산하기 위한 숙주로 많이 이용되고 있다. 그러나 대부분의 경우 대장균에서 발현된 목적 폴리펩타이드는 세포 내에서 불용성 응집체(inclusion bodies)의 형태로 존재하게 된다(Ulman, A., *Gene*, 1984, 29, 27-31; Nilsson, B. et al., *Embo J.*, 1985, 4, 1075-1080; DiGuan et al., *Gene*, 1988, 67, 21-30; La Vallie, E. R. et al., *Bio/Technology*, 1993, 11, 187-193). 이 경우 목적 재조합 단백질이 초기 분리과정에서 세포 배양액으로부터 용이하게 분리될 수 있다는 큰 장점이 있으나, 응집체 형성 과정 중, 발현된 폴리펩타이드가 폴딩(folding) 중간체 단계에서 분자 상호간의 다이실라이드 결합(inter-molecular disulfide bond) 또는 소수성 상호작용(hydrophobic interaction)에 의해 숙주세포의 다른 단백질 분산물들(샤프론, 라이보솜, 초기인자 등)과 비선택적으로 결합함으로써 난용성의 단단한 응집체가 형성되어 실제로 목적하는 단백질을 사용할 수 없게 되기도 한다(Anna Mituraki et al., *Bio/Technology*, 1989, 7, 690-697). 단백질이 불용성 응집체로 생산될 경우 이로부터 활성형 단백질을 순수 분리해내기 위해서는 일반적으로 구아니딘-하이드로클로라이드(guanidine hydrochloride), 우레아(urea) 등의 변성제(denaturant)를 사용하여 용해시킨 후 회식을 통한 리폴딩 과정을 거쳐야 한다. 다이실라이드 결합에 의해 생성된 응집체의 경우는 용해를 위해 환원제(reducing agent)까지 함께 사용하여 처리해야 한다. 또한 리폴딩 공정은 아직까지 많은 문제점이 있어 생산수율을 감소시키는 주요 원인이 되기도 한다(Marston, F. A. O. *Biochem. J.*, 1986, 240, 1-12; Mitraki, A. and King, J., *Bio/Technology*, 1989, 7, 690-697). 철분은 모든 형태의 생물에 있어서 필수적인 영양소로서 대부분이 단백질과 결합되어 여러가지 중요한 생리적 작용에 관여한다. 대표적인 예로서, 철분은 전자전달계(electron transport system)에서 전자를 기질로부터 산소로 이동시키는 역할에 관여함으로써 아데노신 트리포스페이트(adenosine triphosphate)의 생성에 중요한 역할을 한다. 이와 같은 기능과 관련하여, 철분 상태가 정상 이하이면 에너지(energy)의 생산이 감소되어 피로감을 빨리 느끼고 일의 능률 저하를 수반하며, 특히 유아기 때의 철분 결핍은 뇌에 손상을 줄 수 있다.

한편, 페리틴은 철(iron)이 세포에 독성을 나타내지 않고 필요할 때 효과적으로 이용될 수 있도록 철을 저장하는 역할을 하는 단백질로서, 대부분의 동물과 식물 조직은 물론 곰팡이류(fungi)와 세균(bacteria)에도 존재하는 것으로 알려져 있다(Dargatzis, M. et al., *J. Biol. Chem.*, 1990, 265, 18339-18344; Grossman, M. J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89, 2419-2422). 페리틴은 전핵 세포 뿐만 아니라 원핵 세포에서도 염기서열상의 상당한 유사성이 있으며, 각각의 구조 및 기능도 활발히 연구되고 있다. 1분자의 페리틴은 중쇄(Heavy Chain, 21kD; 이하 "H-사슬"이라고 한다) 및 경쇄(light chain, 19 kD; 이하 "L-사슬"이라고 한다)로 구성된 24개의 소단위체(subunit)로 구성되어, H-사슬과 L-사슬의 혼합구성이 항상 일정하지 않아서 구조와 크기가 다양하다. 1분자의 페리틴은 약 4500개의 철분자를 보유할 수 있으며, 이는 0.25 M의 철농도에 해당되는 것으로서 헤모글로빈 약 1200 분자를 생산할 수 있는 양에 해당하는데 L-사슬이 H-사슬에 비해 철분결합 능력이 우수한 것으로 보고된 바 있다(Levi, S. et al., *Bloc*

hem. J., 1992, 288, 591-596). 최근까지 철분결핍에 대한 예방 및 치료 목적으로 동물의 비장 조직으로부터 추출한 동물 헤리틴 제제를 주로 사용하였는데, 동물 바이러스 문제가 대두되면서 지난 2000년 3월 28일부터 식품의약품안전청에 의해 국내 품목허가 취소 및 제조업무 정지 조치가 단행된 바 있다. 따라서 산업적 대량생산을 목적으로 유전자 재조합 기술을 이용하여 재조합 인간 헤리틴의 대량생산이 가능한 공정기술 개발의 필요성이 요구 되었다. 재조합 인간 헤리틴 생산과 관련된 현재까지의 연구 결과로는 인간 헤리틴의 물리화학적/생물학적 특성규명을 목적으로 대장균에서  $\lambda$  phage 프로모터를 이용하여 수용성 형태로 발현시킨 예가 있으나(Levi, S. et al., Biochemistry, 1989, 28, 5179-5184) 발현율(발현된 재조합 단백질의 총 대장균 단백질에 대한 비율, %)이 극히 저조하여(1-5%) 산업적 활용가치는 매우 낮다고 볼 수 있다.

이에 본 발명자들은 T7 프로모터를 이용, 대장균으로부터 재조합 인간 헤리틴 단백질을 불용성 응집체 형태로 대량 생산한 후, 분리된 응집체 내 단백질 분자간의 결합특성을 확인하고 변성제 및 환원제 등을 전혀 사용하지 않고 단순한 pH 시프트(shift) 공정만으로 고농도의 재조합 단백질 응집체가 쉽게 수용성 형태로 전환될과 동시에 철분 결합능력을 갖도록 재활성화(renaturation)된다는 사실을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

## 발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 고농도·고효율로 활성형의 인간 헤리틴 단백질을 생산·분리하기 위하여 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 인간 헤리틴 유전자를 포함하는 발현벡터, 이를 포함하는 대장균 형질전환체 및 상기 형질전환체를 이용하여 헤리틴 단백질을 대량생산하는 방법을 제공하는 것이다.

## 발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 T7프로모터 및 인간 헤리틴 유전자를 포함하는 발현벡터를 제공한다.

또한 본 발명은 상기 발현벡터가 도입된 대장균 형질전환체를 제공한다.

또한 본 발명은 상기 형질전환체를 이용하여 헤리틴 단백질을 대량생산하는 방법을 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 T7프로모터 및 인간 헤리틴 유전자를 포함하는 발현벡터를 제공한다.

인간 헤리틴 유전자는 인간의 간 cDNA 라이브러리로부터 제조될 수 있으며, 본 발명에서는 바람직한 실시예로서 인간의 간 cDNA 라이브러리로부터 PCR 방법을 이용하여 L-사슬 인간 헤리틴 유전자를 중족·제조하여 사용하였다. 중족된 DNA를 정제하여 다음 제환효소를 처리하여 절단하였고, 발현 플라스미드에 삽입하여 L-사슬 인간 헤리틴 유전자를 포함하는 본 발명의 발현벡터를 제조하였으며(도 1 참조), 이를 "pT7-FerL"이라 명명하였다.

또한, 본 발명은 상기 발현벡터가 도입된 형질전환체를 제공한다.

본 발명에서는 상기 발현벡터들을 대장균에 형질전환시켜 형질전환체를 제조하였다. 상기에서 숙주세포로는 대장균 BL21(DE3) 균주를 사용하였으며 발현벡터pT7-FerL에 의해 형질전환된 형질전환체를 "BL21(DE3)/pT7FerL"이라 명명하고, 이를 2001년 5월 23일부터 한국 생명공학연구원 유전자 은행에 기탁하였다(수탁번호; KCCTC 1016BP). 또한, 본 발명은 상기 형질전환체를 이용하여 헤리틴 단백질을 대량생산하는 방법을 제공한다.

상기 헤리틴 단백질을 대량생산하는 방법은

1) T7프로모터 및 인간 헤리틴 유전자를 포함하는 발현벡터 또는 pT7-FerL로 형질전환된 대장균 형질전환체를 배양하는 단계;

2) 세포에서 불용성 단백질 응집체를 분리하는 단계;

3) 단계 2의 불용성 단백질을 알칼리성 용액에 현탁하는 단계 및

4) 상기 용액에 중성의 완충 용액을 적하하여 중성으로 복원하는 단계로 구성된다.

단계 1)에 있어서, 상기 대장균 형질전환체로서 본 발명의 실시예에서는 BL(DE3)/pT7FerL을 사용하였다.

단계 3)에 있어서, 알칼리성 용액은 100 내지 pH 12인 용액이 바람직하며, pH 12인 것이 더욱 바람직하다.

단계 4)에 있어서, 중성 완충용액은 pH 8의 Tris-HCl 완충액을 사용하는 것이 바람직하다.

상기 단계 3)과 단계 4)를 통해서 재조합 인간 헤리틴 단백질을 포함하는 불용성 응집체가 고농도에서 알칼리성 용액에 쉽게 용해되고 중성 pH 조건으로의 복원에 의해 재활성된다. 이러한 특성은 정제공정에서 매우 유용하게 이용될 수 있다. 이후 초여과, 투석, 이온교환 크로마토그래피 등의 일반적인 정제방법을 통해 분리하여 활성 재조합 인간 헤리틴 단백질을 쉽게 얻을 수 있다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

### <실시예 1> L-사슬 인간 헤리틴 단백질을 발현하는 플라스미드의 제조

L-사슬 인간 헤리틴 유전자는 서열번호 1 및 서열번호 2로 기재되는 프라이머쌍을 이용하여 인간의 간 cDNA 라이브러리(Clontech, CA, USA)로부터 PCR 방법으로 중족하여 제조하였다.

PCR은 DNA 증합효소 반응용 완충액 (0.25 mM dNTPs; 50 mM KCl; 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 20 mM Tris-HCl(pH 8.8); 2 mM MgSO<sub>4</sub>; 0.1% Triton X-100)에 주형 DNA 100 ng, 각각의 프라이머 50 pmol을 넣은 다음 Tag DNA 증합효소를 이용하여 수행되었다. 반응조건은 총 30 사이클로 95°C/30sec (denaturation), 52°C/30sec (annealing), 72°C/60sec (elongation)로 하였다. 본 발명에서는 특기하지 않는 한 모든 PCR은 상기의 조건에 따라 수행하였다. PCR이 종료된 다음 증폭된 DNA를 1% 아가로스 겔 상에서 전기영동하여 분석하였다. 증폭된 DNA를 겔 추출 키트(gel extraction kit, Qiagen)를 이용하여 정제한 다음 Nde I과 Hind III 제한효소로 각각 처리하여 5 말단에 Nd

eI 제한효소 부위와 3 말단에 HindIII 제한효소 부위를 갖도록 하여 발현 플라스미드인 pT7-7의 Nde I 과 HindIII 자리에서 삽입하였으며, 이렇게 만들어진 플라스미드를 pT7-FerL이라고 명명하였다(도 1).

#### <실시에 2> 대장균 형질전환체의 제조

Hanahan이 기술한 방법(Hanahan, D., *DNA Cloning*, 1985, 1, 109-135, IRS press)에 의해 상기 발현벡터 pT7-FerL로 대장균 BL21(DE3) (Studier, F. A. and Moffatt, B. A., *J. Mol. Biol.*, 1986, 189, 113-130)균주를 형질전환시킨 다음 염피실린에 저항성이 있는 콜로니를 선별하였다.

상기 형질전환 균주를 2001년 5월 23일부터 한국 생명공학연구원 유전자은행에 기탁하였다(수탁번호: KCTC 1016 BP).

#### <실시에 3> 대장균 형질전환체의 배양 및 제조할 단백질의 생산

하룻밤 동안 배양된 종균 배양액의 일부를 배양 배지(LB 배지, +100 mg/ℓ 염피실린)에 접종(1%)한 다음 37℃에서 200 rpm으로 배양하였다. 배양액의 OD<sub>600</sub>이 0.4에 이르렀을 때에 IPTG(Sigma)를 첨가(0.5 mM)하여 제조할 유전자의 발현을 유도하였다. IPTG 첨가 후 동일한 조건으로 3-4시간 더 배양하였다.

그 결과, 발현된 제조할 인간 헤리틴은 대장균 세포 내에 불용성 응집체의 형태로 존재함을 확인하였다(도 2).

#### <실시에 4> 세포배양액으로부터 불용성 응집체의 분리

세포배양액을 6000 rpm에서 원심분리하여 균체침전물을 회수하였다. 대장균체 침전물을 중류수로 현탁한 다음 초음파 파쇄기(Branson Sonifier)를 이용하여 파쇄하였다. 파쇄액을 5000 g에서 10분간 원심분리한 후 상층액과 침전물을 각각 SDS-PAGE(14% Tris-Glycine gel)로 분석하여 회수 여부를 확인하였다. 단백질 용액에는 0.5% Triton X-100으로 2회 세척한 후 필요한 분석을 수행하였다.

그 결과, 분리된 불용성 단백질 응집체를 SDS-PAGE(14% Tris-Glycine gel)로 분석하여 도3에 나타내었다.

#### <실시에 5> 분리된 단백질 응집체에 포함된 제조할 L-사슬 인간 헤리틴의 재활성화

##### <5-1> 응집체 내에 포함된 제조할 L-사슬 인간 헤리틴 단백질 분자 상호간의 결합특성

생성된 응집체 내 구성단백질간의 (동일한 제조할 단백질 분자간 또는 제조할 단백질과 다른 숙주 단백질 분자간의) 결합특성을 알아보기 위하여 하기와 같은 분석을 수행하였다. 우선 각 응집체 내 단백질들을 각각 환원성 및 비환원성 SDS-PAGE(14% Tris-Glycine gel)로 분리한 뒤 전기영동 결과를 비교하였다.

그 결과, 도 3의 레인 1, 2에서 보듯이 제조할 L-사슬 인간 헤리틴이 응집체 내의 주 단백질임을 알 수 있었으며 직접발현(direct expression)에 의해 생성된 단백질 응집체를 환원성 및 비환원성 조건하에서 분석하고 비교하였을 때 주 경우에서 모두 거의 동일한 양의 제조할 L-사슬 인간 헤리틴이 단량체(monomer) 위치에 존재하고 있음을 파악하였다. 상기 결과는 L-사슬 헤리틴이 응집체 내에서 대부분 동일 분자간의 소수성 상호작용에 의해 결합되어 있음을 의미하며, 이와 같이 동일 단백질간의 공유결합성 결합(disulfide bond)이 아닌 소수성 결합에 의해 생성된 응집체는 정제과정에서 비교적 쉽게 해리될 수 있으므로 정제하기에 매우 용이한 장점이 있다.

##### <5-2> pH 시프트 공정에 의한 제조할 L-사슬 인간 헤리틴의 재활성화: 재활성화 공정의 제조할 단백질 처리 용량 및 제조할 단백질의 활성 분석

제조할 대장균 배양액으로부터 얻은 불용성 단백질을 pH 12의 알칼리성 용액에 현탁한 다음 이를 Tris-HCl pH 완충용액(1 M, pH 8)과 혼합하여 pH를 중성조건으로 복원하는 pH 시프트 공정을 실시하였다. 도 4에서는 pH 시프트 공정 전후의 단백질 용액에 대한 SDS-PAGE 분석 결과를 보여주고 있는데 약 90%의 제조할 인간 헤리틴이 pH 시프트 공정으로 용해되었음을 알 수 있다. 또한 pH 시프트 공정으로 용해될 수 있는 인간 헤리틴의 농도는 0.6-1.0 g/ℓ 범위로 분석되었다. pH 시프트 공정에 의해 일단 용해된 제조할 인간 헤리틴은 1.5배 정도의 농축과정을 거친 후에도 재응집(reaggregation) 현상 없이 수용성 형태로 존재함을 확인하였다.

다음으로 pH 시프트 공정으로 용해된 수용성 제조할 인간 헤리틴의 활성을 철분 결합 능력을 분석함으로써 검증하였다. 먼저 수용성 제조할 인간 헤리틴 용액(50 mg/ℓ)과 Hepes 완충액(1 M, pH 7)을 10:1의 부피비로 혼합한 후, 0.4 mM의 철(II) 염화물 암모늄염(ferrous ammonium sulfate) 용액 내에서 제조할 인간 헤리틴에 철분을 포화시키는 공정을 수행하였다. SDS-PAGE 후 분리된 단백질에 대하여 프러시안 블루 염색(prussian blue staining)을 실시하였는데, 철분과 결합하고 있는 단백질은 염색이 되지만 철분이 결합된 단백질은 염색이 되지 않는다.

그 결과, 도 5에서 보듯이 철분 결합능력이 없는 BSA(bovine serum albumin) 단백질(negative control)은 염색이 되지 않았으나, pH 시프트 공정으로 용해된 제조할 인간 단백질은 확연히 염색이 되었다.

상기 결과로부터 대장균에서 불용성 응집체의 형태로 발현된 제조할 인간 헤리틴은 pH 시프트 공정으로 성공적으로 재활성화 되었음을 확인하였다.

#### 발명의 효과

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 인간 헤리틴 유전자를 포함하는 발현벡터로 형질전환된 형질전환체는 제조할 인간 헤리틴의 L-사슬 단백질을 대량으로 생산하며, 제조할 인간 헤리틴 단백질 발현과 함께 생성된 응집체는 결합력이 약한 소수성 상호작용에 의한 것으로서 일반적으로 일반적인 불용성 응집체(inclusion body)와는 달리 알칼리성 용액에서 낮은 양(0.6-1.0 g/ℓ)이 쉽게 용해되며 중성 pH 조건으로 회귀되면서 고효율로 재활성화 및 뒤으로 활성화된 인간 헤리틴 단백질을 대량으로 생산하는 용도로 유용하게 사용될 수 있다.

#### (57) 청구의 범위

#### 청구항 1.

T7 프로모터 및 인간 웨리틴(ferritin) 경쇄(light chain) 유전자를 포함하는 도 1에 기재된 인간 웨리틴 경쇄의 대량 생산용 발현벡터 pT7-FerL.

**청구항 2.**

삭제

**청구항 3.**

삭제

**청구항 4.**

제 1항의 인간 웨리틴 경쇄 유전자를 포함하는 발현벡터 pT7-FerL로 형질전환된 대장균(*Escherichia coli*) 형질전환체.

**청구항 5.**

제 4항에 있어서, BL21(DE3)/pT7FerL인 대장균 형질전환체(수탁번호: KCTC 1016BP).

**청구항 6.**

1) 제 4항의 대장균 형질전환체를 배양하는 단계;

2) 세포에서 불용성 단백질을 용집체를 분리하는 단계;

3) 단계 2의 불용성 단백질을 알칼리성 용액에 현탁하는 단계 및

4) 상기 용액에 pH 완충용액을 적하하여 중성으로 복원하는 단계로 구성되는 인간 웨리틴 단백질의 제조방법.

**청구항 7.**

제 6항에 있어서, 상기 단계 1)의 대장균 형질전환체는 BL21(DE3)/pT7FerL인 것을 특징으로 하는 인간 웨리틴 단백질의 제조방법.

**청구항 8.**

제 6항에 있어서, 상기 단계 3)의 알칼리성 용액은 pH 10 내지 pH 12인 것을 특징으로 하는 인간 웨리틴 단백질의 제조방법.

**청구항 9.**

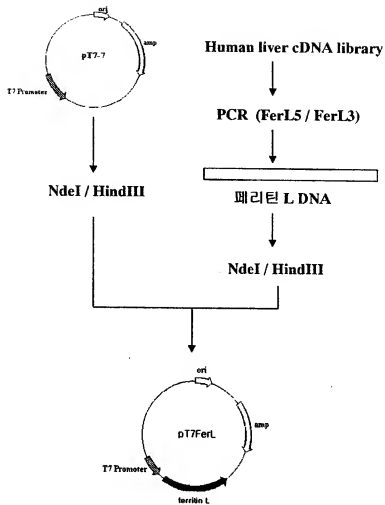
제 6항에 있어서, 상기 단계 4)의 pH 완충용액은 pH 8인 것을 특징으로 하는 인간 웨리틴 단백질의 제조방법.

**청구항 10.**

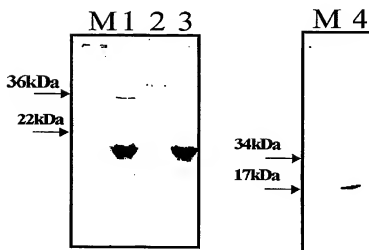
제 9항에 있어서, pH 8의 완충용액은 Tris-HCl 완충액인 것을 특징으로 하는 인간 웨리틴 단백질의 제조방법.

도면

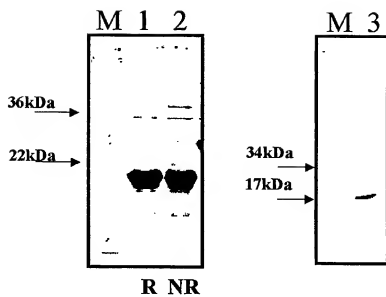
도면1



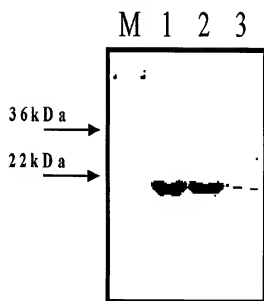
도면2



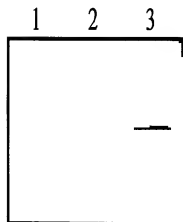
도면3



도면4



도면5



<110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology <120> Expression vector containing  
 gene of human ferritin, transformant thereof and method for preparing human ferritin using the same <13  
 0> 1p-05-17 <160> 2 <170> Kopatentln 1.71 <210> 1 <211> 26 <212> DNA <213> Artifici  
 al Sequence <220> <223> FerL 5' primer <400> 1 ggaattcata tgagctccca gattcg  
 26 <210> 2 <211> 25 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>  
 FerL 3' primer <400> 2 gtccaagctt ttatcgtgc ttgag